

Effects of Sex Steroid Hormones on the Mammary Tumor induced in Hyperprolactinemic Female Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8554

高プロラクチン血症雌ラットの乳腺腫瘍に及ぼす 各種性ステロイドの影響に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

小 濱 隆 文

乳腺の発育と機能に深く関与するとされているプロラクチン (prolactin, PRL) と性ステロイドについて, 7,12-ジメチルベンズ (a) アントラセン (7,12-dimethylbenz (a) anthracene, DMBA) 誘発乳腺腫瘍の発育経過と組織型に及ぼす影響をウイスター (Wistar) 系雌ラットで検討した. 21日齢よりピモジド (pimozide, PMZ) を継続投与して高 PRL 血症状態とし, 73日齢に DMBA を局所投与した. DMBA 局所投与後に, 無処置 (DP 群), エストラジオール・ジプロピオネート (17- β estradiol dipropionate, E2) 1mg/100g 体重を週1回皮下注 (DP+E2 群), テストステロン・エナンテート (testosterone enantate, TE) 6mg/100g 体重を週1回皮下注 (DP+T 群), プロゲステロン (progesterone, Prog) 1mg/100g 体重を週3回皮下注 (DP+Prog 群), デヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone acetate, DHA-Ac) 5mg/100g 体重を週3回皮下注 (DP+DHA 群) した5群とピモジド非投与に DMBA を局所投与した群 (D 群) について, 乳腺腫瘍の腫瘍径測定と光学および電子顕微鏡による組織像の観察を行なった. 腫瘍発育については, 腫瘍径が10mm前後で停滞する時期が認められ, その後急速に増大する経過を示した. 腫瘍急速増大開始日は, D群の 85.2 ± 28.7 日に比して, DP 群は 61.8 ± 20.2 日と有意に短縮 ($p < 0.05$), DP+DHA 群は 118.1 ± 16.8 日, DP+E2 群は 99.9 ± 23.3 日と DP 群に比して, 有意に延長していた ($p < 0.05$). 腫瘍急速増大速度はD群と DP 群の間に有意の差を認めなかったが, DP+DHA 群では DP 群に比し有意に増加していた ($p < 0.05$). 腫瘍の組織型分類においては, 上皮性腫瘍の占める割合は, D群 25%, DP 群 91%, DP+Prog 群 46%, DP+E2 群 28%, DP+T 群 25%, DP+DHA 群 0% であり, DP 群に比べて各種性ステロイド投与群では低下していた ($p < 0.05$). 腺癌が認められた割合は, D群 13%, DP 群 82%, DP+Prog 群 46%, DP+E2 群 28%, DP+T 群 25%, DP+DHA 群 0% で, Prog 群を除くすべての性ステロイド投与群では DP 群と比較して有意に低下していた ($p < 0.05$). 以上より, PRL は DMBA 誘発乳腺腫瘍の上皮性腫瘍, 特に腺癌の発生に促進的に作用し, E2, T, および DHA は腺癌の発生に抑制的に作用することが示唆された.

Key words adenocarcinoma, dehydroepiandrosterone, DMBA-induced mammary tumor, prolactin

子宮内膜と乳腺はともに性ホルモン依存性の組織であり, いずれの組織もエストロゲン (estrogens, E) の増加により肥大・増殖し, その低下に伴って萎縮・退縮する. このような変化は思春期および更年期において明確に認められる. しかし更年期以降ではEの分泌はある程度保たれるものの, 卵巣機能の低下によりプロゲステロン (progesterone, Prog) の分泌はほとんど消失するため, いわゆる無抵抗エストロゲン (unopposed E) の状態となる. このような状態下では子宮内膜はかえって過形成となることが知られている. また, 同様の変化は乳腺においてもみられ, 更年期に乳房痛などの症状となって現われてくる. 子宮内膜や乳腺の腫瘍組織もまた, E, Prog, テストステロン (testosterone, T) など各種性ホルモン濃度の多寡により増殖または退縮することが知られている. しかし, 副腎性アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandroste-

rone, DHA) との関係を検討した報告は極めて少ない.

本研究では, 各種性ホルモンと女性性器腫瘍との関連性について考究する目的で, 高プロラクチン (prolactin, PRL) 血症雌ラットの乳腺に 7, 12-ジメチルベンズ (a) アントラセン (7, 12-dimethylbenz (a) anthracene, DMBA) を局所投与することにより乳腺腫瘍を高率に発生させ, ついで腫瘍の発生・発育およびその組織型に及ぼす各種性ステロイドの影響について比較検討した.

材料および方法

1. 実験動物

生後21日齢の体重 40~50g のウイスター (Wistar) 系雌ラット (日本チャールズ・リバー, 厚木) を購入し実験に供した. 飼育条件としては, 室温を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ に保ち, 人工照明は午前5時

平成6年3月3日受付, 平成6年4月7日受理

Abbreviations: DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-Ac, dehydroepiandrosterone acetate; DMBA, 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene; E, estrogens; E2, 17- β estradiol dipropionate; H. E., hematoxylin and eosin; PMZ, pimozide; PRL, prolactin; Prog, progesterone; SD, Sprague-Dawley; T, testosterone; TE, testosterone enantate

より午後7時までの14時間とし、飼料はオリエンタル NMF ラット繁殖用(オリエンタル酵母工業, 東京)を用い、自由摂取とした。飼育には 35×30×16cm のケージを用い、1ケージあたりのラット数は2ないし3匹とした。

II. 実験方法

1. 薬剤および投与方法

ピモジド (pimozide, PMZ) 溶液は、Advis らの方法¹⁾を改良したものを用いた。すなわち、PMZ (藤沢薬品工業, 大阪) 原末 10mg, ブドウ糖 (和光純薬, 大阪) 10g を、0.1M 酒石酸 (和光純薬) 50ml とともに水 950ml に溶解した。また、PMZ を含まない対照液も作成した。なお、PMZ 溶液および対照液は毎日交換し、実験群ごとに21日齢より自由飲用させた。

DMBA (和光純薬) は、ゴマ油 (半井化学薬品, 京都) に溶解し、40mg/ml の溶液として使用した。投与方法は、73日齢に、ラットをエーテル麻酔し、右鼠径部の剃毛後皮膚に約 1cm の切開を加え、直視下に発育した乳腺を確認したのち、DMBA 溶液 0.1ml (DMBA 4mg 含有) を、27ゲージ針付微量注射器を用いて局所に注射した。その後切開創を絹糸で縫合閉鎖し、3日後に抜糸した。性ステロイド剤は、17-β エストラジオール・ジプロピオネート (17-β estradiol dipropionate, E2, 5mg/ml; オバホルモンデポー), テストステロン・エナンテート (T enanthate, TE; 125mg/ml; エナルモンデポー), Prog 10mg/ml; ルテウムの各製剤 (帝国臓器製薬, 東京) と、帝国臓器製薬製のデヒドロエピアンドロステロン・アセテート溶液 (DHA acetate, DHA-Ac; 50mg/ml) を使用した。なお、ホルモン剤の投与は、背部皮下に針を刺入部位より約 1cm 通した後に注入し、その後しばらく刺入部位を圧迫し漏れのないことを確認した。

2. 実験群の作成

1) PMZ 投与下の乳腺組織の観察

21日齢の雌ラット12匹を各6匹ずつ、PMZ 投与群と PMZ 非投与群の2群に分けた。両群のラットの37日齢と73日齢に、それぞれ3匹ずつ断頭屠殺し、右鼠径部乳腺の組織学的観察を行った。

2) DMBA 誘発乳腺腫瘍の観察

21日齢の雌ラット69匹を、PMZ 非投与 DMBA 投与群 (D 群, 16匹), DMBA・PMZ 投与群 (DP 群, 11匹), DMBA・PMZ・E2 投与群 (DP+E2 群, 11匹), DMBA・PMZ・TE 投与群 (DP+T 群, 10匹), DMBA・PMZ・Prog 投与群 (DP+Prog 群, 11匹), DMBA・PMZ・DHA-Ac 投与群 (DP+DHA 群, 10匹) の6群に分け、PMZ 又は対照液投与を開始した。73日齢に乳腺組織内へ DMBA を局所投与し、また、性ステロイド投与群に対しては、E2 は 1mg/100g 体重を週1回、TE は 6mg/100g 体重を週1回、Prog は 1mg/100g 体重を週3回、DHA-Ac は 5mg/100g 体重を週3回それぞれ皮下に投与した。

3. 腫瘍の計測とその発育段階

乳腺の観察は、DMBA 投与後視診・触診により行った。腫瘍を触知した場合には、週3回その長径と短径をノギスを用い測定し、両者の平均値をもって腫瘍径とした。腫瘍の発育に関しては、腫瘍径測定の後方視的 (retrospective) 検討から、次のように発育段階を定義した。すなわち、DMBA 投与日を第0日とし、腫瘍径が 10mm 前後で一時的に腫瘍の増大が停滞したのち急速に増大し始めた日を腫瘍急速増大開始日とした。また、腫瘍急速増大開始日から屠殺日までを腫瘍急速増大期間とし、

この期間における腫瘍径の1日平均増加量を腫瘍急速増大速度とした。なお、腫瘍急速増大の開始日は、腫瘍径が測定毎に増加し、かつ2週間で 5mm 以上の増大を示した最初の測定日とし、腫瘍径が 50mm 以上になったとき、あるいは腫瘍径が 30mm 以上でかつ潰瘍を伴うときに断頭屠殺した。

4. 光学顕微鏡 (光顕) および電子顕微鏡 (電顕) 試料の作製 摘出した腫瘍を細切し試料の作製に供した。光顕用試料は、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H. E.) 染色を行った。透過電顕用試料は、1% グルタルアルデヒドと 4% ホルマリンの混合液 (0.1M カコジル酸緩衝液で PH7.4 に調製) で1時間固定、さらに 2% オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液で PH7.4 に調製) で1~2時間固定したのち、上昇エタノール系列で脱水し、エポンで包埋した。試料をウルトラトームで超薄切片とし、酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色を施した。観察には HU-600 (日立, 東京), JEM-1210 型 (日本電子, 東京) 電子顕微鏡を用い、600~20,000倍の直接倍率で観察した。

5. 腫瘍の組織学的分類

腫瘍の組織学的分類は、乳癌研究会の分類基準²⁾に従った。各群において認められた腫瘍を上皮性腫瘍と非上皮性腫瘍に分け、その割合を求めた。さらに、各群において腺癌を認めたラットの割合を求め比較検討した。

6. 統計学的検討

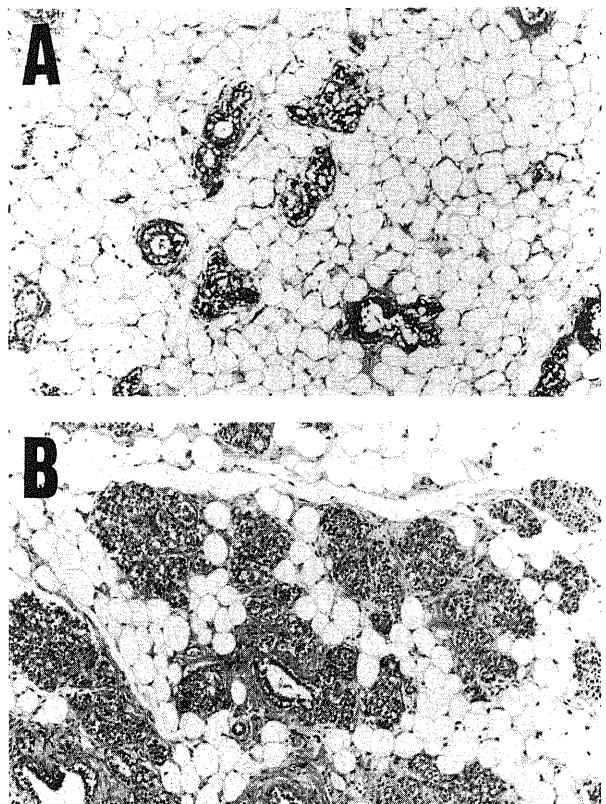


Fig. 1. Light microscopic findings of the mammary tissue of 37-day-old control rat and pimozide-treated rat. (A) The control rat. Poorly developed alveolar cells are seen (×84, H. E. stain). (B) The pimozide-treated rat. There are markedly developed alveolar cells (×84, H. E. stain).

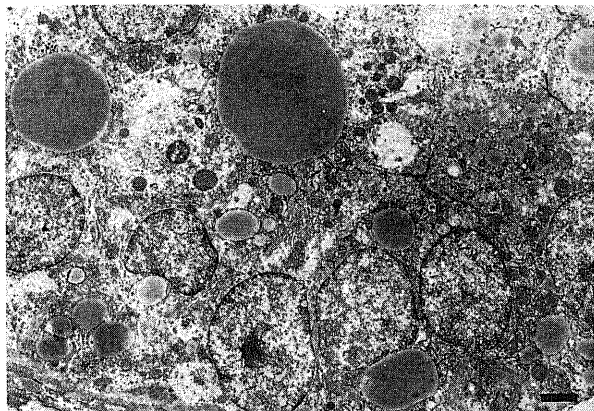


Fig. 2. Electron micrograph of the mammary gland of 73-day-old pimozone-treated rat. There are many lipid droplets in the cytoplasm. Scale bar indicates 2 μ m.

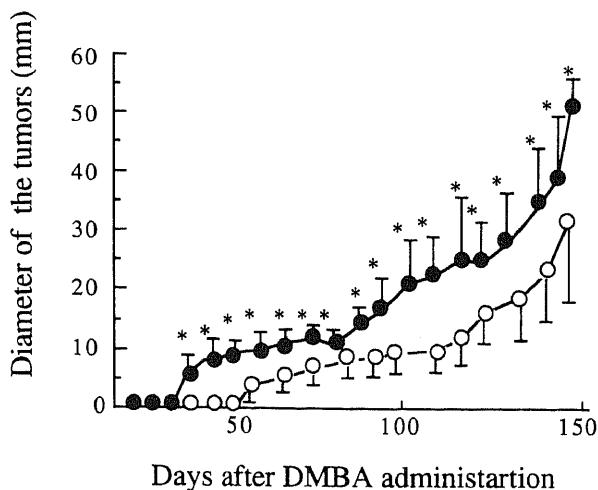


Fig. 3. Diameters of tumors in DMBA+pimozone (DP) group and DMBA (D) group. The diameter of tumors in DP group was larger than that in D group on 30 days after DMBA administration. ●, DP group; ○, D group. * $p < 0.05$ vs. D group. (⊥) and (⊥) indicate standard deviation.

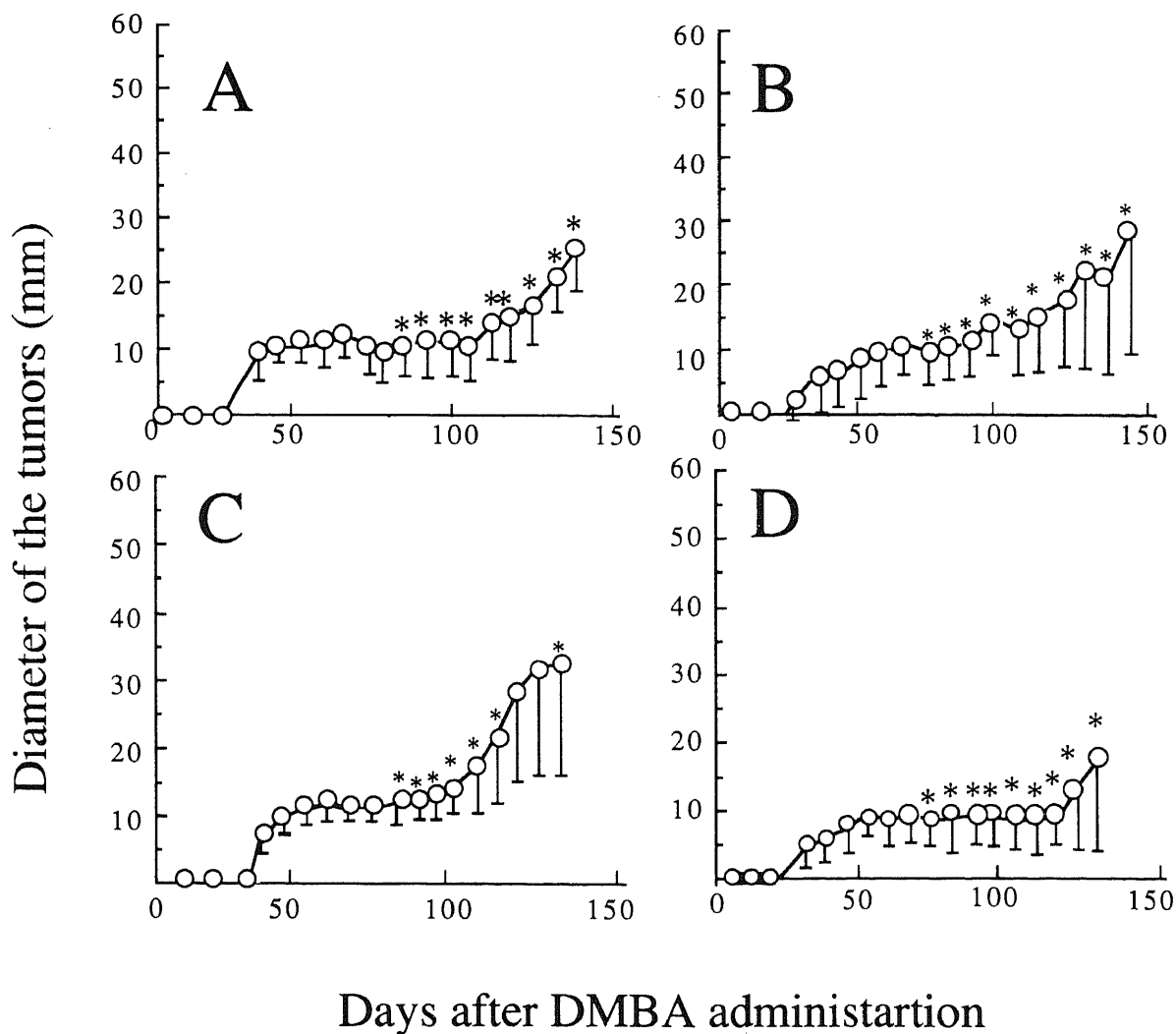


Fig. 4. The effects of steroid on the growth of tumors in DMBA+pimozone (DP) group and steroid treated groups. After the onset of tumor growth in DP group, the diameters of tumors in all steroid treated groups were smaller than that in DP group (refer to Fig. 3). A, DP+17 β estradiol; B, DP+testosterone; C, DP+progesterone; D, DP+dehydroepiandrosterone-acetate. * $p < 0.05$ vs. DP group (refer to Fig. 3).

実験結果の統計学的検討については、独立2群における平均値の差の検定の場合には等分散検定のあと二標本 t 検定 (two sample t test) またはウェルチ法 (two sample t test with Welch's correction) により行った。なお、測定値はすべて平均値±標準偏差で表示した。独立2群間における期待値の差の検定はカイ二乗検定により行い、また、実測度数に5以下の数値がある場合は、フィッシャー (Fisher) の直接確立計算法を用いて行った。

成 績

I. PMZ 投与下の乳腺の組織学的変化

PMZ の投与・非投与両群における37日齢および73日齢の乳腺組織の観察所見は次のごとくであった。37日齢では、PMZ 非投与群の乳腺が肉眼的に白色であったのに対し、PMZ 投与群では淡黄色を呈し、乳野は増大していた。また、光顕的には、PMZ 投与群では腺管および腺房の発育を認め、腺上皮と腺腔には空胞と好塩基性分泌物を認めた (図 1A, B)。73日齢で

は、PMZ 非投与群の乳腺が退縮していたのに対し、PMZ 投与群では暗黄色の著明に発達した乳腺を認め腺上皮が著しく増殖し、多量の分泌物が貯留している像が観察された。電顕像では腺上皮および腺腔内に多数の脂肪滴と蛋白性分泌物が観察された (図 2)。

II. DMBA 誘発腫瘍発育の観察

DMBA を投与したすべてのラットに腫瘍の発生が認められた。各群における腫瘍の経日の変動を腫瘍径で比較すると、DP 群では D 群に比し DMBA 投与後30日以降において有意に大きかった ($p < 0.05$) (図 3)。また、DP+E2 群、DP+T 群および DP+DHA 群の腫瘍径は、DP 群に比し70~80日以降において有意に小さかった ($p < 0.05$)。なお、DP+Prog 群において

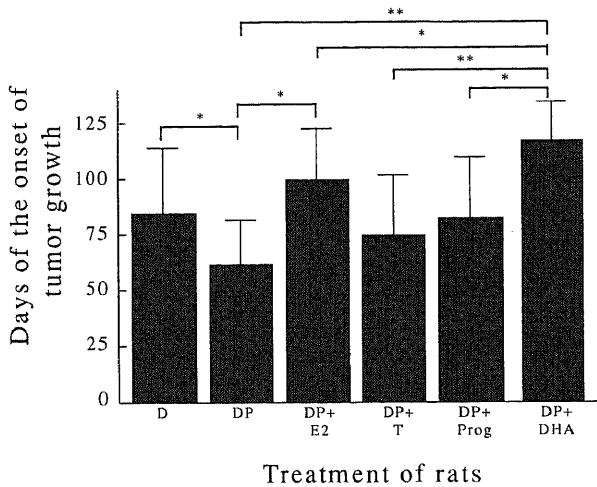


Fig. 5. Period from the day of DMBA administration to the day of onset of rapid tumor growth in DMBA-induced rat mammary tumors. The period in DP group was 23 days shorter than that in DMBA group. On the other hand, the period in DP+dehydroepiandrosterone group was 51 days longer than that in DP group. D, DMBA; DP, DMBA + pimoziide; DP+E2, DP+17 β estradiol; DP+T, DP+testosterone; DP+Prog, DP+progesterone; DP+DHA, DP+dehydroepiandrosterone acetate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (T) indicates standard deviation.

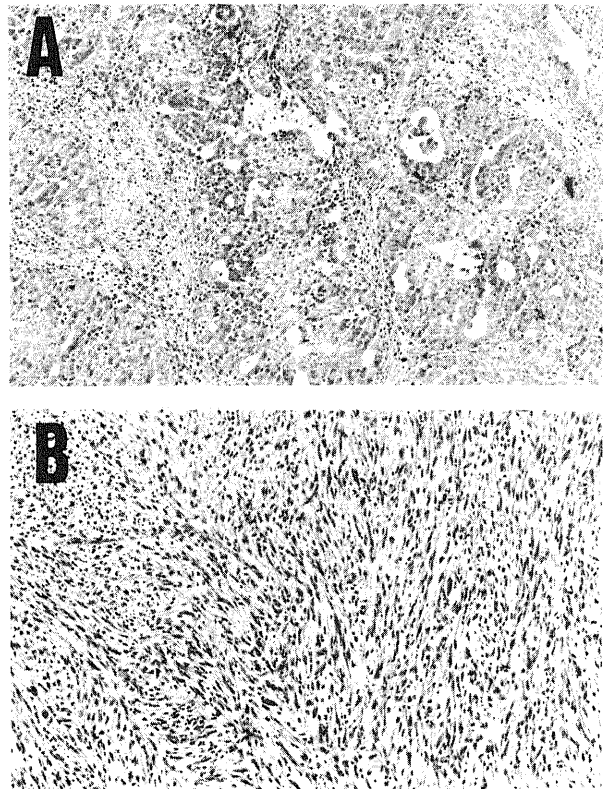


Fig. 6. Typical light microscopic findings of DMBA-induced mammary tumor. (A) Adenocarcinoma of the mammary tumor ($\times 84$, H. E. stain). (B) Sarcoma of the mammary tumor. Note ductal pattern in (A) and spindle shaped tumor cells in (B) ($\times 84$, H. E. stain).

Table 1. The histological types of DMBA-induced mammary tumors under the administration of pimoziide and several steroids administration

DMBA administrated group ^{a)}	Number of rats used	Number of bearing tumor with the histological types of							
		Adenocarcinoma	Adenocarcinoma +sarcoma	Fibroadenoma +sarcoma	Hyperplasia	Sarcoma	Fibrosarcoma	Fibroma	Fibroma +sarcoma
D	16	2	N.D. ^{b)}	1	1	6	4	2	N.D.
DP	11	8	1	N.D.	1	1	N.D.	N.D.	N.D.
DP+E2	7	1	1	N.D.	N.D.	4	N.D.	1	N.D.
DP+T	8	2	N.D.	N.D.	N.D.	2	2	2	N.D.
DP+Prog	11	5	N.D.	N.D.	N.D.	4	2	N.D.	N.D.
DP+DHA	10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4	2	3	1

a) D, DMBA; DP, D+pimoziide; DP+E2, DP+17 β estradiol; DP+T, DP+testosterone; DP+Prog, DP+progesterone; DP+DHA, DP+dehydroepiandrosterone-acetate.
 b) N.D., not detected.

も同様に DP 群に比し有意に小さかった ($p < 0.05$) が, DMBA 投与後110日以降では有意の差は認められなかった (図 4A, B, C, D).

D 群および DP 群の腫瘍急速増大開始日は, それぞれ 85.2 ± 28.7 日, 61.8 ± 20.2 日であり, D 群に比し DP 群において有意の短縮が認められた ($p < 0.05$) が, 腫瘍急速増大速度はそれぞれ 0.9 ± 0.6 mm/日および 0.6 ± 0.2 mm/日であり両群の間で有意の差は認められなかった. 各種性ステロイド投与群の腫瘍急速増大開始日は, DP+DHA 群 118.1 ± 16.8 日, DP+E2 群 99.9 ± 23.3 日, DP+Prog 群 82 ± 27.5 日, DP+T 群 75.1 ± 27.1 日であり, DP 群に比較して DP+DHA 群および DP+E2 群でそれぞれ有意の延長が認められた ($p < 0.01$, $p < 0.05$). また性ステロイド投与群間の比較では, DP+DHA 群において, DP+E2 群, DP+Prog 群および DP+T 群に比しそれぞれ有意の延長が認められた ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) (図 5).

腫瘍急速増大速度は, DP+E2 群 0.7 ± 0.2 mm/日, DP+T 群 0.7 ± 0.4 mm/日, DP+Prog 群 1.0 ± 0.5 mm/日, DP+DHA 群 1.1 ± 0.5 mm/日であり, DP 群の 0.6 ± 0.2 mm/日に比し DP+DHA 群で有意に大きかった ($p < 0.05$) が, 性ステロイド投与群間での比較では有意の差は認められなかった.

なお, 腫瘍の発育状態については, 腫瘍径が 30mm 以上の時点で, DP+E2 群および DP+T 群において腫瘍の潰瘍部に出血傾向がみられた. また, 本実験のいずれの群においても他臓器への転移は認められなかった. なお, 本実験群全ラットのうち, DP+E2 群で11匹中4匹, DP+T 群で10匹中2匹が腫瘍死以外の原因によって死亡したが, これらは実験成績から除外した.

Ⅲ. DMBA 誘発乳腺腫瘍の組織型

各群において認められた腫瘍の組織型を表 1 に示した. 腫瘍のうち上皮性腫瘍としては腺癌と線維腺腫がみられ, 非上皮性

腫瘍としては肉腫, 線維肉腫, 線維腫などが認められた. なお, 腺癌は組織学的に管状腺癌 (図 6A), 乳頭状腺癌, 腺様嚢胞癌などの像を呈していた. また, 肉腫には種々の異型度を示す大小の紡錘形細胞が束状・渦状に集合配列している像が認められた (図 6B).

D 群および DP 群において上皮性腫瘍の占める割合は, それぞれ 25%, 91% であり, DP 群で有意の増加が認められた ($p < 0.01$). また, 性ステロイド投与群における上皮性腫瘍はすべて腺癌であった. 各群における上皮性腫瘍の割合は, DP+Prog 群 46%, DP+E2 群 28%, DP+T 群 25%, DP+DHA 群 0% と, いずれの投与群においても DP 群の 91% に比し有意に低下していた ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). また性ステロイド投与群間における比較では, DP+DHA 群が DP+Prog 群に比し有意に低下していた ($p < 0.05$) (図 7).

D 群および DP 群において腺癌がみとめられたラットの割合は, それぞれ 13%, 82% であり, DP 群で D 群に比し有意に高率であった ($p < 0.01$). 性ステロイド投与群における腺癌がみとめられたラットの割合は, DP+Prog 群 46%, DP+E2 群 28%, DP+T 群 25%, DP+DHA 群 0% であり, DP 群に比し DP+E2 群, DP+T 群および DP+DHA 群で有意に低かった ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). また, 性ステロイド投与群間における比較では, DP+DHA 群が DP+Prog 群に比し有意に低率であった ($p < 0.05$) (図 8).

考 察

DMBA は四環式芳香族炭化水素系の発癌物質の一つであり, 広く発癌実験に使用されており³⁾, その経口投与によってラットに高率に乳癌を発生させることはよく知られている⁴⁾. しかし, その場合には白血球, 肺癌, 卵巣癌, 副腎壊死を合併することが多く, これは DMBA の発癌作用やその毒性が全身に及ぶためと考えられている⁵⁾. したがって, DMBA を経口的に投

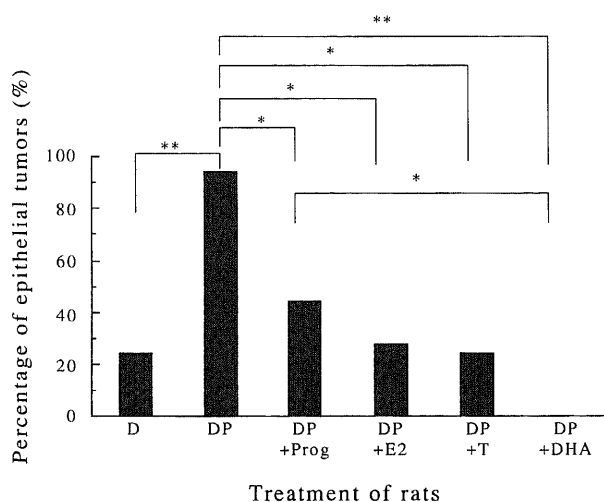


Fig. 7. Percentage of epithelial tumors. Epithelial tumors were dominant in DP group. The percentage of epithelial tumors were reduced by a treatment with steroids, especially by dehydroepiandrosterone-acetate injection. D, DMBA; DP, D+pimozide; DP+E2, DP+17 β estradiol; DP+T, DP+testosterone; DP+Prog, DP+progesterone; DP+DHA, DP+dehydroepiandrosterone-acetate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

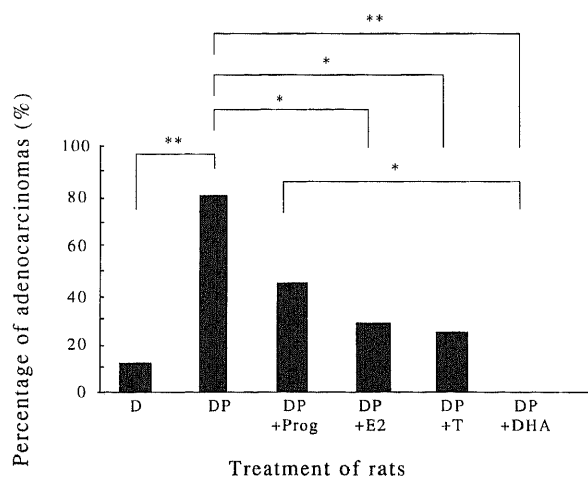


Fig. 8. Percentage of adenocarcinomas in each groups. Adenocarcinomas were dominant in DP group. The percentage of adenocarcinomas were reduced by steroid treatment, especially by dehydroepiandrosterone-acetate injection. D, DMBA; DP, D+pimozide; DP+E2, DP+17 β estradiol; DP+T, DP+testosterone; DP+Prog, DP+Progesterone; DP+DHA, DP+dehydroepiandrosterone-acetate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

与する方法では、他の臓器に影響を与えることなく選択的に乳癌だけを発生させることは困難であるとされてきた。この点を解決するために、森井ら⁶⁾は、DMBAを乳腺部位に直接投与する方法を考案した。すなわち、60~90日齢のスプラグ・ドレイ (Sprague-Dawley, SD) 系雌ラットの乳腺部に、DMBAペレット (DMBA粉末5mgを高圧圧縮して作製したもの) を埋没する方法であり、埋没後130~150日後にラット11匹のうち9匹に大豆大以上の乳腺腫瘍が発生し、その腫瘍の内訳は腺癌が4例、線維腺腫2例、線維腫3例であったと報告している。なお、剖検によって他の臓器に腫瘍の発生はみられず、腫瘍の遠隔転移や副作用も認められなかったとしている。また、DMBAを埋没投与した部位には限局性の壊死巣が形成され、その周囲に線維性の被膜が認められたことから、DMBAが被膜内に長く留まったことが腫瘍の発生につながったものと推察している⁷⁾。このように、森井らの局所投与法は副作用が少ないことと、選択的に乳腺腫瘍を発生させるという点では非常に優れた方法といえるが、腺癌の発生率が約36%と低率であることから、腺癌を高率に発生させる実験系としては難がある様である。森井らの方法で腺癌が高率に発生しなかった理由としては、ペレットにしたDMBAが乳腺上皮にうまく取り込まれなかったことや、正常ラットの静止期乳腺ではその大部分が脂肪組織などの間質系の組織であるためDMBAが乳腺上皮に作用し難いことによるものと考えられる。

そこで今回の実験では、まずDMBAを油に溶解し、乳腺組織に取り込まれ易いようにした。さらに雌ラットに高RPL血症を惹起させ乳腺上皮を肥大させることにより、DMBAが乳腺上皮に直接作用し易いように配慮した。高PRL血症誘発法およびDMBAの投与時期の問題については、Advisら⁸⁾は21日齢からラットに中枢性ドーパミン抑制作用を有するPMZを自由摂取させると、投与後早期から高PRL血症状態が持続的に維持され、その際に内因性のEおよびProgの上昇が認められると報告している。PRLはEおよびProgの存在下で乳腺の増殖と分泌機能亢進をもたらすが⁹⁾、今回の実験では同様に21日齢からPMZを投与したところ37日齢においてすでに乳腺は肥大・増殖し、肉眼的に識別されやすくなっていた。さらに、73日齢の光顕・電顕所見では、上皮の増殖による間質の相対的な減少や上皮細胞における多数の脂肪滴の出現が認められ、この点から貯留した脂肪滴にDMBAが溶け込み長く乳腺上皮内に留まり易い状態にあるものと推察された。したがって、本研究ではDMBA投与日を73日齢とした。なお、本実験のDP群において腺癌が認められたラットの割合は82%とD群に比し高率であり、また他臓器の腫瘍発生や転移も認められず、腫瘍によるラットの死亡例も認められなかったことなどから、本法はウイスター系雌ラットに乳癌を発生させるための良い方法と考えられた。

乳癌は性ホルモン依存性の腫瘍であるが、このことは乳癌の自然発生が動物種に関係なく雌性に多くみられること、実験的にも雌ラットの去勢によりその発生が抑制されることなどからも広く知られている。乳癌に対し現在行なわれているホルモン療法には、E療法、T療法、Prog療法などがあり、いずれも大量投与によって治療効果が認められている¹⁰⁾ものの、その投与方法や投与量についての一定の方法は未だに確立されていない。E療法については、一般に閉経後の末期患者に用いられ、最近では副作用の少ないヘクセストール (hexestrol) 1日量

30~50mgを連日経口投与する方法が用いられている。1960年の米国医学協会 (American Medical Association) の報告では、閉経後の患者364人中137人に他覚的な寛解が認められたとしている¹¹⁾。T療法においては、進行乳癌あるいは術後再発した閉経期前の乳癌の患者が主な治療対象となっており、テストステロン・プロピオネート (testosterone propionate) を1日量50~100mgを隔日筋注するのが一般的な方法とされ、20~30%の患者に有効と報告されている¹²⁾。Prog療法は、乳癌に対する有効率がE剤やT剤投与に比して一般に低く、あまり行なわれていなかったが、近年閉経後の患者にメドロキシプロゲステロン・アセテート (medroxyprogesterone acetate) を1日量1200mgで連日経口投与することにより高い有効率が認められるとされている¹³⁾¹⁴⁾。しかし、長期投与により肝障害、男性化現象、出血傾向、血栓症などを併発するために、その投与量には限界があった。そこで近年は、E受容体を介してE拮抗作用を示す抗E剤が広く使用されるようになってきている。このうちタモキシフェン (tamoxifen) は、副作用が少なく我が国でも広く使用されており、30~40%の奏効率が報告されている。本実験のDP+E2群、DP+T群、DP+Prog群におけるホルモン投与量は、上記の臨床投与量における一週間の総投与量を参考とし¹⁵⁾、ラットの体重100gあたりに換算し決定した。

DMBA誘発乳癌においては、大量のEによって乳癌の発育が抑制されるといわれており¹⁶⁾、Welsch¹⁷⁾は組織培養実験の成績から大量のEが腫瘍細胞のPRLによるDNA合成を抑制するとしている。また、Eにみられるこれらの抑制効果はPRLの腫瘍増殖作用を抑制するためであることが、ラットのDMBA誘発乳癌腫瘍を用いた最近の研究からも明らかにされてきている¹⁷⁾。本実験のDP+E2群で腺癌が認められたラットの割合がDP群と比較して有意に減少していたことから、Eは腺癌の発生に抑制的に働くものと考えられた。大量のTはラットのDMBA誘発乳癌の発生率を減少させ、乳癌の増殖を抑制する¹⁸⁾、この抑制作用は腺癌細胞のPRL受容体の働きを抑制することに基づくものとされている¹⁹⁾。今回の実験結果でも、T投与により腺癌が認められたラットの割合は有意に減少していた。ProgはE受容体を減少させることにより乳癌の発育を抑制するとされている²⁰⁾が、今回DP+Prog群の腺癌が認められたラットの割合には有意の減少は認められず、腺癌発生に対する抑制作用は弱いように思われた。

一方、DHAと乳癌や乳腺腫瘍との関連については、進行乳癌患者では初期乳癌患者に比し血中DHAおよびDHA-サルフェート (DHA-sulfate) の値が有意に低下しているとの報告²¹⁾²²⁾がみられるが、乳癌に対するDHAの作用については現在のところ明らかにされていない。なお、今回のような実験系で実験的乳腺腫瘍に及ぼす影響を他のステロイドと比較検討した報告はあまりみられないようである。Schwartzら²³⁾は、乳腺腫瘍自然発生系のマウスに対してDHAを投与しその乳癌発生率が著しく減少したと報告している。またBoccuzziら²⁴⁾は、SD系ラットのDMBA誘発乳癌に対し、DHAを1日2mg連日経口投与して抗腫瘍効果を認めたとしている。したがって、DHAは発癌起始 (イニシエーション) や発癌促進 (プロモーション) を阻害することにより抗腫瘍作用を示すものと考えられる。なお、DHAの投与量に関しては、Pellionら²⁵⁾がラット体重100gあたり0.6~3mg/日のDHAを投与することで乳腺上皮に対して十分影響を与えるとしているが、本実験の

DHA-Ac 投与量はこれを参考に決定したものである。今回の実験では、DP+DHA 群の DMBA 投与日から腫瘍急速増大開始日に至る期間が DP 群に比し著しく延長し、他の性ステロイド投与群と比較しても有意に延長していた。また、腺癌が認められたラットの割合も DP 群に比し有意に減少していた。これらのことから、DHA は乳癌に対してその発生を強く抑制するものと考えられた。

Jabara ら²⁰は、DMBA の発癌作用が強いほど DMBA 投与日から腫瘍の増大が開始する期間が短縮し、腺癌の発生率が高くなるとの報告をしている。すなわち、DMBA の発癌作用の強さと腺癌の発生率との関連性をみるため、DMBA 粉末 500mg, 100mg, 30mg をラット鼠径部乳腺内に直接投与し、DMBA の投与量が少ないほど腺癌の発生率が低下し、また、その際腺癌の発生率が減少するに従い腫瘍の増大が開始する時期が延長したとしている。本実験においても、腺癌が認められたラットの割合が高いほど DMBA 投与日から腫瘍急速増大開始日に至る期間が短く、その発生割合が低いほど延長する傾向が認められた。このことから、E2, TE および DHA-Ac の投与は、いずれも DMBA の発癌作用に抑制的に作用するものと考えられた。

一般に、E, T および Prog の大量投与における抗腫瘍効果は現在のところホルモン受容体、中でも特に E 受容体と PRL 受容体を介してもたらされると考えられており、これら性ホルモンの抗腫瘍効果の機序に関する研究は多く¹⁷⁻²⁰なされているが、DHA の腺癌発生に対する抑制機序についての報告は少ないようである。Schulz ら²¹は DHA 投与により腺癌細胞の細胞増殖が抑制され、細胞周期が第一間隙期で停止したと報告しており、また Pashko ら²²は DHA がヒトの乳腺上皮細胞の DNA 合成を抑制することを報告している。受容体に関しては、Bocuzzi ら²³は、DHA が誘発乳腺腫瘍を抑制した際には E 受容体の量的な変化は認められなかったとしている。さらに近年は各種臓器における DHA の受容体の存在についても研究されてきている²⁰。DHA-Ac 投与群において認められた今回の結果から、DHA-Ac が乳腺の上皮細胞の発達を抑制し、上皮性腫瘍の発生を低下させる可能性があるものと推察された。しかし、その抑制機序の詳細についてはなお不明であり今後の研究を待たねばならない。

以上のことから、幼若期より高 PRL 血症状態にした雌ラットを用い、DMBA の乳腺内局所投与で誘発した乳腺腫瘍には乳癌が高率に認められ、実験的乳癌の作成方法として本法は有用なものと考えられた。また、各種性ステロイド投与の影響についての比較から、E, T および DHA が腺癌の発生に対していずれも抑制的に作用するものと考えられた。

結 論

幼若期より高 PRL 血症状態にした雌ラットを用い、DMBA の乳腺内局所投与により発生させた DMBA 誘発乳腺腫瘍の発生・発育およびその組織型に及ぼす各種性ステロイド投与の影響を検討し、以下の結論を得た。

1. 幼若期雌ラットに、21日齢より PMZ を投与し、37日齢、73日齢の乳腺を観察したところ、37日齢で乳腺の増大が認められ、73日齢では著しい上皮細胞の増殖と、腺上皮および腺腔内の多数の脂肪滴と蛋白性分泌物が観察された。
2. 高 PRL 血症状態で DMBA の局所投与により誘発されたすべての乳腺腫瘍は、腫瘍径が 10mm 前後に達したのち腫瘍

の増大が一時期停滞し、その後再び急速に増大し始めた。

3. D 群および DP 群の腫瘍急速増大開始日は、それぞれ 85.2 ± 28.7 日、 61.8 ± 20.2 日、腫瘍急速増大速度は 0.9 ± 0.6 mm/日、 0.6 ± 0.2 mm/日であり、D 群に比し DP 群において腫瘍急速増大開始日の短縮が認められた。また、上皮性腫瘍の占める割合は DP 群では 91% で、D 群の 25% に比べ高率であり、腺癌が認められたラットの割合は DP 群では 82% で D 群の 13% と比べ高率であった。

4. 各種性ステロイド投与群における腫瘍急速増大開始日および腫瘍急速増大速度は、DP+E2 群で 99.9 ± 23.3 日、 0.7 ± 0.2 mm/日、DP+T 群で 75.1 ± 27.1 日、 0.7 ± 0.4 mm/日、DP+Prog 群で 82.0 ± 27.5 日、 1.0 ± 0.5 mm/日、DP+DHA 群で 118.1 ± 16.81 日、 1.1 ± 0.5 mm/日であり、DP 群に比較し腫瘍急速増大開始日は DP+E2 群および DP+DHA 群で有意に延長し、腫瘍急速増大速度は、DP+DHA 群で DP 群に比し有意に大きかった。また、各種性ステロイド投与群間での比較では、腫瘍急速増大開始日は、DP+DHA 群で他の性ステロイド投与群に比し有意に延長していた。

5. 性ステロイド投与群における上皮性腫瘍の割合は、DP+Prog 群 46%、DP+E2 群 28%、DP+T 群 25%、DP+DHA 群 0% であり、DP 群に比し DP+E2 群、DP+T 群、DP+DHA 群において有意に少なく、性ステロイド投与群間の比較では、DP+DHA 群が DP+Prog 群に比し上皮性腫瘍の割合が有意に低かった。

6. 性ステロイド投与群において腺癌が認められたラットの割合は、DP+Prog 群 46%、DP+E2 群 28%、DP+T 群 25%、DP+DHA 群 0% であり、DP 群に比し DP+E2 群、DP+T 群、DP+DHA 群において有意に少なく、性ステロイド投与群間の比較では、DP+DHA 群が DP+Prog 群に比し腺癌をもつラットの割合が有意に低かった。

以上のことから、高 PRL 血症雌ラットを用い DMBA 局所投与により誘発した乳腺腫瘍は、乳癌に関する実験にとって有用なものと考えられた。また、E, T および DHA は、腺癌の発生に対して抑制的に作用するものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり貴重な御助言を賜りました金沢大学医学部病理学第一講座、中西功夫教授に深謝いたしますとともに、終始ご指導戴きました赤祖父一知助教授ならびに研究の遂行にご協力下さいました寺田 督講師、山口稔毅技官をはじめ教室員各位、穴田幸子、相川みち代、棚田留美子の各事務官に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第13回世界産科婦人科学会議(シンガポール、1991)において発表した。

文 献

- 1) Advis, J. P., Richards, J. S. & Ojeda, S. R.: Hyperprolactinemia-induced precocious puberty. Studies on the mechanism(s) by which prolactin enhances ovarian progesterone responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats. *Endocrinology*, **108**, 1333-1342 (1981).
- 2) 乳癌研究会編: 乳腺腫瘍の組織学的分類。乳癌取り扱い規約, 第10版, 15-23 頁, 金原出版株式会社, 東京, 1989.
- 3) Russo, J., Saby, J., Isenberg, W. M. & Russo, I.

- H.: Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 435-445 (1977).
- 4) 福西 亮: 乳腺. 化学物質と癌の発生 (小田嶋成和, 橋本嘉幸編), 第1版, 301-311頁, 学会出版センター, 東京, 1978.
- 5) Daniel, P. M. & Prichard, M. M. L.: Further studies on mammary tumors induced in rats by 7, 12-dimethyl (a) anthracene (DMBA). *Int. J. Cancer*, **2**, 163-177 (1967).
- 6) 森井外吉, 岡村博文, 山田日出美, 吉村慈郎, 今 清, 有光敬子: 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene による発癌に於ける臓器素因; DMBA ペレットによる偏平上皮癌, 腺癌, 中皮腫, および肉腫の誘発. *日体質誌*, **30**, 39-45 (1966).
- 7) 村上隼夫: 乳腺局所発癌に関する実験的研究. *関西医大誌*, **32**, 44-61 (1980).
- 8) Stockdale, F. E., Juergens, W. G. & Topper, Y. J.: A histological and biochemical study of hormone-dependent differentiation of mammary gland. *Develop. Biol.*, **13**, 266-281 (1966).
- 9) Murad, T. M.: Ultrastructural study of mammary gland during pregnancy. *Anat. Rec.*, **167**, 17-36 (1969).
- 10) 佐藤文三: エストロゲン依存性腫瘍増殖とタモキシフェン動物モデルによる検討一. 乳癌における内分泌治療の進歩 (癌の臨床別集13) (癌の臨床編), 第1版, 16-27頁, 篠原出版, 東京, 1987.
- 11) 藤森正夫, 坂内五郎: 内分泌療法. 乳房, 現代外科学大系 (第29巻) (石川浩一, 木村忠司, 佐野圭司, 羽田野野茂, 赤倉一郎, 井口 潔, 三枝正裕, 陣内伝之助, 杉江三郎, 橋本義雄, 堀 原一, 榎 哲男編), 第2版, 191-223頁, 中山書店, 東京, 1974.
- 12) 泉雄 勝: 進行・再発例の治療. 乳房の外科, 新外科学大系 (18巻) (出月康夫, 川島康正, 杉町圭蔵, 高木 弘, 戸部隆吉, 堀 原一, 武藤輝一, 森岡恭彦編), 第1版, 277-282頁, 中山書店, 東京, 1988.
- 13) Lundgren, S., Kvinnsland, S. & Utaaker, E.: Oral high-dose progestins as treatment for advanced breast cancer. *Acta Oncol.*, **28**, 811-816 (1989).
- 14) Stomper, P. C., Van Voorhis, B. J., Ravnkar, V. A. & Meyer, J. E.: Mammographic changes associated with postmenopausal hormone replacement therapy: a longitudinal study. *Radiology*, **174**, 487-490 (1990).
- 15) Kiedzik, G. S., Bradley, C. J., Marshall, S., Campbell, G. A. & Meites, J.: Effect of high doses of estrogen on prolactin-binding activity and growth of carcinogen-induced mammary cancer in rats. *Cancer Res.*, **36**, 3265-3268 (1976).
- 16) Welsch, C. W. & Rivera, E. M.: Differential effects of estrogen and prolactin on DNA synthesis in organ cultures of DMBA-induced rat mammary carcinoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 623-626 (1972).
- 17) Meites, J., Cassell, E. & Clark, J.: Estrogen inhibition of mammary tumor growth in rats; counteraction by prolactin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 1225-1227 (1971).
- 18) Costlow, M. E., Buschow, R. A. & McGuire, W. L.: Prolactin receptors and androgen-induced regression of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma. *Cancer Res.*, **36**, 3324-3329 (1976).
- 19) Quadri, S. K., Kledzik, G. S. & Meites, J.: Counteraction by prolactin of androgen-induced inhibition of mammary tumor growth in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 875-878 (1974).
- 20) Sasaki, G. H. & Leung, B. S.: On the mechanism of hormone action in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor. I. Prolactin and progesterone effects on estrogen receptor in vitro. *Cancer*, **35**, 645-651 (1975).
- 21) Adams, J. B., Archibald, L. & Clarke, C.: Adrenal dehydroepiandrosterone and human mammary cancer. *Cancer Res.*, **38**, 4036-4040 (1978).
- 22) Abul-Hajj, Y. J.: Metabolism of dehydroepiandrosterone by hormone dependent and hormone independent human carcinoma. *Steroids*, **26**, 488-500 (1975).
- 23) Schwartz, A. G.: Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (Avy/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.*, **39**, 1129-1132 (1979).
- 24) Boccuzzi, G., Aragno, M., Brignardello, E., Tamagno, E., Conti, G., Monaco, M., Racca, S., Danni, O. & Carlo, F.: Opposite effects of dehydroepiandrosterone on the growth of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinomas. *Anticancer Res.*, **12**, 1479-1484 (1992).
- 25) Pellion, F. & Racadot, J.: Actions comparees de la testosterone, dehydroepiandrosterone (D. H. A.) et du sulfate dehydroepiandrosterone sur la fonction gonadotrope hypophysaire de la ratte prepubere. *Ann. Endocrin. paris*, **26**, 419-428 (1965).
- 26) Jabara, A. G. & Anderson, P. S.: Effects of progesterone on mammary carcinogenesis when various doses of DMBA were applied directly to rat mammae. *Pathology*, **14**, 313-316 (1982).
- 27) Schulz, S., Klann, R. C., Schonferd, S. & Nyce, J. W.: Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone: role of isoprenoid biosynthesis. *Cancer Res.*, **52**, 1372-1376 (1992).
- 28) Pashko, L. L., Shwartz, A. G., Garbia, A. M. & Swern, D.: Inhibition of DNA synthesis in mouse epidermis and breast epithelium by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Carcinogenesis*, **2**, 717-721 (1981).
- 29) Shao, T. C., Castaneda, E., Rosenfield, R. L. & Liao, S.: Selective retention and formation of a Δ 5-androstenediol-receptor complex in cell nuclei of the rat vagina. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3095-3100 (1974).

Effects of Sex Steroid Hormones on the Mammary Tumor induced in Hyperprolactinemic Female Rats
Takafumi Kohama, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-
J. Juzen Med Soc., 103, 567-575 (1994)

Key words adenocarcinoma, dehydroepiandrosterone, DMBA-induced mammary tumor, prolactin

Abstract

The present study was performed to investigate the effects of prolactin and sex steroid hormones on the mammary tumor induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in Wistar female rats. Into rats which had been sustained hyperprolactinemia induced by pimozone (PMZ) from 21st day of age, 4 mg of DMBA was injected locally into the mammary glands at the 73rd day. The rats were divided into 5 groups and received the following steroid hormone injection subcutaneously; steroid free (DP group), estradiol dipropionate 1 mg/100 g body weight (BW) once a week (DP+E2 group), testosterone enantate 6 mg/100 BW once a week (DP+T group), progesterone 1 mg/100 BW 3 times a week (DP+Prog group), or dehydroepiandrosterone acetate 5 mg/100 BW 3 times a week (DP+DHA group). The growth pattern and histological classification of the tumors in these 5 groups and pimozone-untreated rats (D group) were examined. All of the tumors in these experiments grew to a size of 10 mm in diameter and remained the same size for some period, and then increased in size rapidly again (onset of rapid tumor growth). The period from the day of DMBA administration to the day of onset of the rapid tumor growth in DP group (61.8 ± 20.2 days) was shorter than in D group (85.2 ± 28.7 days) ($p < 0.05$), and the period in DP+DHA and DP+E2 group was longer than in DP group ($p < 0.05$). The daily mean rate of increase in the diameter in D group showed no difference when compared with DP group, but in DP+DHA group, the rate was greater than in DP group ($p < 0.05$). The ratios of epithelial tumor were 25% in D group, 91% in DP group, 46% in DP+Prog group, 28% in DP+E2 group, 25% in DP+T group and 0% in DP+DHA group. The ratios of epithelial tumor in all of the steroid groups were lower than DP group ($p < 0.05$). The ratios of adenocarcinoma were 13% in D group, 82% in DP group, 46% in DP+Prog group, 28% in DP+E2 group, 25% in DP+T group and 0% in DP+DHA group. The ratios of adenocarcinoma in all of the steroid groups except in Prog group were lower than in DP group ($p < 0.05$). These results suggest that PRL increases the incidence of epithelial tumor and adenocarcinoma in DMBA-induced mammary tumors, and E2, TE and DHA-Ac decrease the incidence of adenocarcinoma.